

ETUDE LONGITUDINALE DE CERTAINS COMPOSANTS
DU PRODUIT DE RINÇAGE
DU SILLON GINGIVO-DENTAIRE

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

Wolfgang STEUBE

de

Genève

Thèse N° 312

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**ETUDE LONGITUDINALE DE CERTAINS COMPOSANTS
DU PRODUIT DE RINÇAGE
DU SILLON GINGIVO-DENTAIRE**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

Wolfgang STEUBE

de

Genève

Thèse N° 312

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Giorgio Cimasoni, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 2 août 1974

Le doyen :
William Geisenðorf

Thèse No 312



Nous désirons exprimer notre profonde gratitude au professeur G. Cimasoni pour l'intérêt et l'aide précieuse qu'il nous a apporté tout au long de l'élaboration de ce travail.

Nous tenons également à remercier pour leur précieuse collaboration :

- Mademoiselle R. Wagner, assistante en médecine dentaire.
- Mademoiselle E. Andersen, laborantine.
- Mademoiselle N. Léonard, laborantine.
- Madame I. Condacci, laborantine.
- Monsieur R. Wiedmer, mécanicien de précision.
- Monsieur F. Métral, dessinateur.

A MES PARENTS

A MA CHERE FEMME

A MES ENFANTS

Etude longitudinale de certains composants du produit
de rinçage du sillon gingivo-dentaire.

1. INTRODUCTION

La région marginale est la partie du parodonte entourant le collet de la dent. L'épithélium gingival s'insère au niveau du tissu dur dentaire par l'intermédiaire de l'attache épithéliale (32). Chez un individu jeune, la limite inférieure de cette attache se situe au niveau de la jonction ciment-émail. Le sillon gingivo-dentaire, ayant normalement une profondeur de 0,5 à 1 mm (36) est limité par la paroi dure dentaire et, du côté gingival, par de l'épithélium du type buccal (36). Cet épithélium buccal se continue, au niveau de l'attache épithéliale par l'épithélium jonctionnel (36).

Le renouvellement des cellules épithéliales gingivales a été étudié par plusieurs auteurs (22, 5, 29, 37). Il a été établi que la vitesse de renouvellement de l'épithélium formant la paroi du sillon gingivo-dentaire est plus élevée que celle de l'épithélium buccal du bord libre de la gencive.

Dans des conditions normales, en l'absence d'inflammation, on retrouve peu de cellules blanches dans le conjonctif de la gencive marginale. Par contre, en présence d'inflammation, un infiltrat cellulaire sera visible sur des coupes histologiques (35). Il est connu que de nombreux polynucléaires pénètrent dans la cavité buccale en passant à travers l'épithélium du sillon gingivo-dentaire (26).

Les cellules épithéliales desquamées, ainsi que les cellules de la lignée blanche, se retrouvent au niveau du liquide apparaissant au niveau marginal et appelé fluide ou exudat gingival. Le fluide gingival en quantité directement proportionnelle au degré d'inflammation de la gencive marginale, a été décrit tout d'abord par WAERHAUG (42). La preuve irréfutable de sa présence a été fournie par BRILL et coll.: l'administration de fluorescéine chez le chien ou chez l'homme

est suivie de l'apparition de liquide fluorescent au niveau du sillon gingivo-dentaire (8, 9, 10).

Le fluide gingival a une composition assez complexe (12): on y trouve tous les éléments du sérum avec, en plus certains composants qui indiquent son origine inflammatoire (12). En outre, le fluide gingival contient des cellules épithéliales et des leucocytes ainsi que des bactéries.

Certains enzymes d'origine lysosomale ou bactérienne ont été décrits au niveau de cet exsudat: il a été en particulier démontré que la concentration de la beta-glucuronidase et cathepsine D dans le fluide était en corrélation positive avec la gravité de l'atteinte parodontale (3,23,40,41).

Il faut rappeler que l'on peut collecter du fluide gingival en quantité suffisante seulement en présence d'un degré assez intense d'inflammation de la gencive (7,14). VALAZZA a essayé de détourner cette difficulté en collectant du fluide dans des cas de gingivite initiale par une méthode standardisée comportant l'emploi de papiers filtres (41). Il convient, cependant, de rappeler que l'insertion de tout objet dans un sillon gingivo-dentaire entraîne un certain degré d'irritation (15, 12), ce qui n'est pas sans influencer les résultats des analyses que l'on voudra effectuer.

Le but du présent travail a précisément été de décrire un appareillage permettant de récolter le produit de lavage des régions marginales au niveau de toute une arcade sans qu'aucune irritation soit causée au niveau du sillon gingivo-dentaire. Les aspects techniques de la construction de l'appareillage ont été décrits auparavant (31, 38). Dans notre recherche nous avons mis au point une série de méthodes d'analyse biochimique des composants des produits de lavage et nous en avons étudié le comportement dans le temps.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Méthode pour récolter le produit de rinçage de la région marginale.

Pour récolter ce produit de rinçage nous avons utilisé l'appareil mis au point par OPPENHEIM (31) tel qu'il a été adapté pour nos recherches par SUDAN (38). Il s'agit d'une gouttière individuelle adaptée à l'arcade et confectionnée en résine autopolymérisante. Au niveau du bord gingival, une rainure a été creusée dans la gouttière tout au long des collets des dents. A la hauteur de la canine et de la première molaire, à gauche et à droite, deux trous ont été percés dans lesquels deux fins tuyaux de polyéthylène ont été soudés: les tuyaux relient l'appareil à un cylindre. Ce cylindre se compose de deux compartiments d'une contenance de 5 ml chacun et séparés par un piston. Ce piston a une action de pomper en faisant un mouvement de va-et-vient et en agissant dans un compartiment par pression et dans l'autre par aspiration.

Pour effectuer des lavages on agit comme suit: la gouttière est insérée en bouche après avoir été légèrement chauffée, ce qui en facilite l'insertion. Après quelques minutes, la gouttière s'étant refroidie, l'extrémité d'un des tuyaux est plongée dans une solution de NaCl à 9 % tandis que l'autre est branchée sur un compartiment du cylindre. A l'aide du piston on aspire la solution physiologique jusqu'à ce que le compartiment soit rempli. On connecte ensuite l'extrémité libre à l'autre compartiment du cylindre et on met la pompe en marche. Le mouvement de va-et-vient du piston imprime ce même mouvement au liquide physiologique, qui balaie ainsi les collets des dents. Au bout de dix minutes, la pompe est arrêtée et le produit de rinçage ainsi obtenu est prêt à être soumis aux différentes analyses.

2.2. Analyses enzymatiques.

2.2.1. Phosphatase acide.

La méthode de ROBINSON et WILLCOX (33) a été utilisée pour la détermination de la phosphatase acide. Cette méthode est basée sur l'emploi d'un substrat fluorescent, le 4-méthylumbelliferyl phosphate, dilué à la concentration de 0,1 mM dans du tampon acétate 0,05 M pH 5.

0,5 ml de solution de rinçage gingival sont pré-incubés au bain-marie à 37°C pendant 5 min. Après adjonction de 0,5 ml de solution de substrat, le tout est incubé au bain-marie à 37°C pendant 5 min. La réaction est arrêtée en ajoutant 1,5 ml de tampon glycocolle 0,5 M pH 10,4. La lecture de l'analyse se fait en utilisant comme référence une solution " blanc " préparée de la même façon, dans laquelle les 0,5 ml de solution de rinçage ont été remplacés par 0,5 ml de HCl à 0,9 %. La lecture a été réalisée sur un fluorimètre Aminco-Fluoro, en utilisant une longueur d'onde de 364 m μ pour la lumière excitante et une longueur d'onde de 448 m μ pour la lumière émise.

Les résultats des analyses ont toujours été exprimés en microgrammes (μ g) de méthylbelliférone libérés par 30 min et par microlitre (μ l) de solution. Pour ce faire, Une courbe standard a été établie en employant des solutions de méthylumbelliférone à des concentrations connues, allant de 0,02 μ g par ml à 1 μ g par ml, dans du tampon glycocolle 1M pH 10. La courbe standard portait en abscisse la concentration de méthylumbelliférone et en ordonnées l'activité d'émission mesurée au fluorimètre. Elle permettait donc de transformer les résultats des lectures de solutions inconnues en μ g de méthylumbelliférone. De plus, après analyse du contenu en protéines, les résultats ont été exprimés sous forme d'activité spécifique, c'est-à-dire, μ g de méthylumbelliférone par μ g de protéines par 30 min.

2.2.2. Phosphatase alcaline.

La méthode de FERNLEY et WALKER (19), que nous avons employée pour la détermination de l'enzyme phosphatase alcaline, est également basée sur l'utilisation de 4-méthylbelliferilphosphate comme substrat. Celui-ci a été cette fois dilué à la concentration de 1 mM dans du tampon amédiol (12 amino-2-méthyl-1,3 propandiol) 0,05 M pH 8,8.

Pour l'analyse, 0,5 ml de solution de rinçage et 0,5 ml de tampon amédiol sont incubés pendant 5 min à 37°C: 0,1 ml de la solution de substrat sont ensuite ajoutés et le tout est laissé au bain-marie à 37°C pendant 30 min. La réaction est stoppée par adjonction de 1 ml d'une solution de phosphate de potassium (KH_2PO_4) à la concentration de 1 M à pH 10,4.

Les lectures ont également été faites au moyen de fluorimètre de façon semblable à ce qu'il a été décrit pour la phosphatase acide. La même courbe standard utilisée pour la phosphatase acide a été employée comme référence. Les résultats ont été exprimés en μg de méthylbelliférone par 30 min. et par ml de solution de rinçage.

Après analyse de la concentration en protéine et en DNA, les résultats ont également été exprimés sous forme d'activité spécifique, c'est-à-dire μg de méthylumbelliférone par μg de protéines par 30 min.

2.2.3. Béta-glucuronidase.

Pour la détermination de cet enzyme nous avons utilisé la méthode décrite par MEAD (28). Le substrat préconisé par cet auteur est le 4-méthylumbelliférone-béta-D-hydrate de glucuronide dissous dans du tampon acétate 0,1 M (pH 4,6) pour obtenir une concentration de 0,1 mM.

Pour l'analyse 0,45 ml de solution de rinçage gingival sont incubés pendant 5 min à 37°C. Après adjonction de 0,05 ml de substrat le tout est laissé au bain-marie à 37°C pendant 30 min. Au bout de 30 min la réaction est stoppée par adjonction de 2 ml de tampon glycolle, 0,1 M pH 10,4. Les lectures ont été faites au fluorimètre à la longueur d'onde de 264 m μ pour la lumière excitante et à la longueur d'onde de 448 m μ pour la lumière émise. Une courbe standard a été établie de la même façon que pour les phosphatases. Les résultats ont été, comme pour les phosphatases, exprimés en μ g de méthylumbelliférone par ml de solution de rinçage gingival pendant 30 min.

2.2.4. Cathepsine D.

Pour la détermination de la cathepsine D, nous avons employé la méthode de ANSON (1), basée sur l'hydrolyse par l'enzyme de la molécule d'hémoglobine.

0,2 gr d'une préparation d'hémoglobine en poudre (Sigma Nr. H 2500) sont dissous dans 10 ml d'acide citrique, à la concentration de 1/10 molaire. On y ajoute 1,5 ml de tampon Mac Ilvaine pH 4,9. Celui-ci est obtenu en mélangeant du phosphate de sodium (Na_2HPO_4) à la concentration de 1/5 molaire et de l'acide citrique à la concentration de 1/10 molaire. Pour obtenir le pH final de 3,5 préconisé par l'auteur, on mélange la solution d'hémoglobine et du tampon Mac Ilvaine pH 4,9 en quantité égale .

Pour l'analyse de la cathepsine D, 100 ml de solution de rinçage gingival ont été ajoutés au mélange de la solution d'hémoglobine et de tampon et une incubation a été faite au bain-marie à 37°C pendant 23 h. Au bout de ce laps de temps, la réaction d'hydrolyse de la molécule d'hémoglobine par l'enzyme a été stoppée par l'adjonction de 2,5 ml d'acide trichloracétique, à la concentration de 0,3 normale et à la température de 4°C. A une solution " blanc ", préparée de la même façon mais sans incubation, ont été ajoutés 100 ml de solution de rinçage. Les deux solutions ont alors été filtrées à 4°C avec du papier filtre L1 50.

La lecture a été réalisée sur un spectrophotomètre (BECKMAN DB-GT) à la longueur d'onde de $280 \text{ m } \mu$, en utilisant des cuvettes de quartz. Les résultats des analyses ont été exprimés par la différence entre l'absorption de la solution à tester et la solution " blanc ", ceci par ml de solution de rinçage.

2.3. Détermination des protéines.

Pour la détermination des protéines, nous avons employé la méthode décrite par LOWRY (27), basée sur l'utilisation du réactif au phénol de Folin. Cette technique demande la préparation simultanée d'une solution " blanc ", de la solution à analyser et des solutions " standard " servant à la préparation de la courbe standard. Pour la solution " blanc ", on prend 0,5 ml d'eau distillée, pour l'analyse 0,5 ml de solution de rinçage et pour les solutions standard, 0,5 ml de solutions dont les taux de protéines sont connus. A chacune de ces fractions, on ajoute 2,5 ml de " réactif C ", préparés au préalable de la façon suivante: 50 ml d'une solution de carbonate de soude à 2 % dans de la soude caustique à la concentration de 0,1 N sont additionnés d' 1 ml d'une solution de sulfate de cuivre cristallisé ($\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) à 0,5 % dans du tartrate de sodium ou de potassium à 1 %. Après avoir laissé les tubes au repos pendant au moins 10 min à la température ambiante on ajoute dans chacun 0,25 ml de " réactif D ". Le réactif D, également préparé au préalable, se compose d'une solution de Folin-Ciocaltophénolique diluée dans l'eau dans les proportions de 1 : 3. Après adjonction du réactif D et au bout d'au moins 30 min, la lecture a été faite au spectrophotomètre (BECKMAN D U) en utilisant une longueur d'onde de $750 \text{ m } \mu$. Du résultat de la solution de rinçage on retranche celui de la solution " blanc ". Les résultats des solutions à taux de protéines connues servent à l'établissement d'une courbe standard. Celle-ci portait également en abscisse la concentration de protéines et en ordonnée l'extinction. Elle permettait donc l'expression des protéines en μg par ml de la solution de rinçage.

2.4. Analyse de l'acide désoxyribonucleique (DNA).

La méthode utilisée pour l'analyse de cette substance a été décrite par KISSANE et ROBINS (24). Elle est, elle-même, une modification de la synthèse de quinaldine DOEBNER-MILLER et permet la détermination du DNA grâce à sa transformation en un produit fluorescent.

L'analyse du DNA peut être scindée en deux étapes:

- La première consiste à éliminer toute substance autre que le DNA de la solution à analyser.
- La deuxième à transformer le DNA grâce à l'acide diaménobenzoïque 3,5 (DABA) en un produit fluorescent permettant une lecture au fluorimètre.

Pour extraire les protéines gênantes de la solution de rinçage, on ajoute à 200 μ l de celle-ci 500 μ l d'acide trichloracétique 0,6 N. Après centrifugation de 5 à 10 min à 2000 tours par minute on a obtenu un surnageant et un culot formé principalement de DNA et de lipides. On prélève approximativement 600 μ l de surnageant que l'on jette. Pour éliminer les lipides de ce culot, on lui fait subir des traitements successifs à l'alcool. D'abord, on y ajoute 1000 μ l d'une solution d'acétate de potassium alcoolisé 0,1 N. Après 10 min de repos à la température ambiante, une nouvelle centrifugation permet d'obtenir un culot contenant le DNA et un surnageant formé par une partie des lipides. Approximativement 1000 μ l du surnageant sont éliminés et on ajoute 1000 μ l d'alcool absolu au résidu. Puis on couvre le flacon avec une feuille de paraffine et on chauffe le tout au bain-marie à 60°C pendant 20 min. Nouvelle centrifugation, d'où nouvelle séparation en surnageant et culot. Comme précédemment on élimine approximativement 1000 μ l de surnageant et on ajoute au culot une nouvelle fois 1000 μ l d'alcool absolu. Après une dernière centrifugation, le précipité restant a été séché au dessiccateur, le surnageant ayant été éliminé.

Ayant l'analyse proprement dite du DNA, on prépare une solution fraîche de DABA. Cette préparation se fait de la manière suivante: 0,3 gr de DABA (ALDRICH) pur ont été dissous dans 1 ml d'acide chlorhydrique 4 N. Puis on décolore avec du Novit A.

Pour l'analyse du DNA contenu dans le résidu issu de la dernière centrifugation, on ajoute à celui-ci 500 μ l de cette solution fraîche de DABA en agitant fortement. On ferme soigneusement le flacon avec un film de paraffine et on chauffe au bain-marie à 60°C pendant 30 min. Au bout de ce temps 3,2 ml d'acide perchlorique 0,6 N ont été ajoutés en agitant fortement.

La lecture a été faite au fluorimètre avec des filtres primaires 4-7 1112 et secondaires 4-7254. Comme pour la détermination des protéines, une courbe standard allant de 0 jusqu'à 200 μ g par ml a été établie comme suit: 20 mg de DNA (Sigma) ont été dissous dans 10 ml d'une solution d'ammoniaque 1 N et dilués pour obtenir différentes concentrations de DNA. On a fait subir à ces solutions les mêmes traitements comme décrit ci-dessus. La courbe standard a permis de transformer les résultats de la lecture en μ g par ml de DNA.

2.5. Contrôle de la méthode d'analyse.

Dans la première partie de notre étude, nous avons procédé à un contrôle des méthodes d'analyses. Pour ce faire, nous avons effectué un lavage gingival chez un sujet avec l'appareillage décrit plus haut: pendant dix minutes nous avons fait circuler 5 ml de solution physiologique dans la rainure de la gouttière individuelle. Au bout de ce temps, le lavement a été arrêté et nous avons pris six échantillons du produit de rinçage pour y effectuer chaque fois la même analyse d'après les procédés décrits plus haut. Chaque méthode servant à l'analyse d'un composant du produit de rinçage a donc été contrôlée six fois au niveau du même produit de rinçage.

2.6. Etude sur la variabilité des composants dans trois lavages successifs.

Dans cette deuxième phase de notre étude nous avons voulu étudier le comportement de certaines substances lorsqu'on procède à trois lavages se succédant immédiatement l'un après l'autre. Comme précédemment nous avons mis notre dispositif en place et après un premier lavage de 10 minutes nous avons récolté la solution physiologique qui avait baigné les collets et les gencives pendant ce temps. Immédiatement après, sans avoir ôté l'appareil ou changé quoique ce soit, nous avons procédé au deuxième lavage qui a également duré dix minutes. Après récolte de ce liquide, le troisième lavage d'une durée identique a suivi.

2.7. Etude sur la variabilité des différents composants du produit pendant la journée.

Pour étudier ce problème, nous avons procédé pendant dix jours à trois lavages gingivaux par jour à des moments déterminés. Nous avons choisi 08.00h, 12.00h et 16.00h pour faire ces lavages avec un matériel identique. Comme pour toute la durée de nos expériences, le sujet n'a pas obtenu de consigne particulière quant à l'hygiène buccale. Toutefois, avant chaque lavage, l'état des muqueuses a été examiné pour s'assurer qu'il n'y avait pas de lésion grossière.

2.8. Etude longitudinale des différents composants du produit de rinçage.

La dernière étape de notre étude a porté sur une durée de dix-sept jours. Pendant ce temps, à l'exception des samedis et des dimanches, nous avons effectué dix lavages sur dix jours à raison de un lavage par jour, à midi. Comme précédemment, l'appareillage et les conditions expérimentales n'avaient subi aucune modification.

3. RESULTATS

3.1. Contrôle des méthodes d'analyse.

Au début de notre travail nous avons procédé à des vérifications de la précision des différentes méthodes d'analyse. Le tableau I donne, pour chaque composant, les moyennes calculées d'après les résultats de six analyses répétées dans le même échantillon de produit de rinçage.

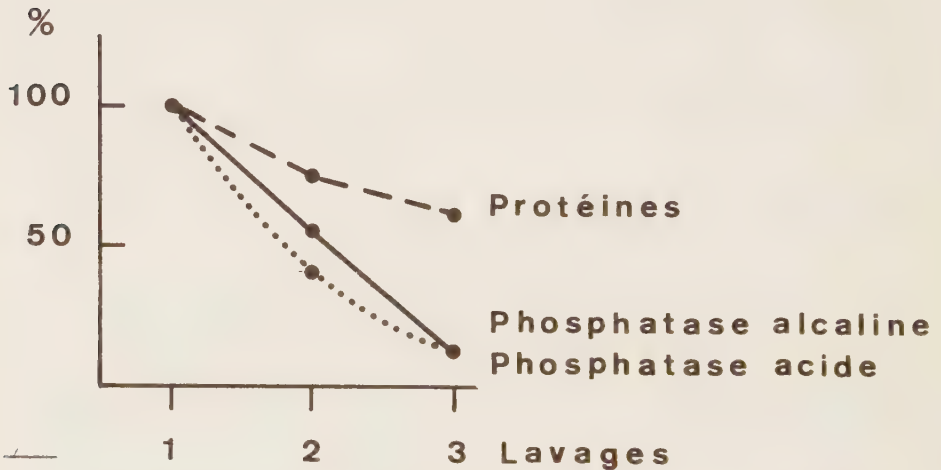
	Phosphatase acide	Phosphatase alcaline	Béta-glucuronidase	Cathepsine D	Protéines	DNA
-						
X	1,1083	0,04833	0,05233	0,05633	38,333	7,5
S	0,061	0,003	0,001	0,004	0,816	0,775
CV	5,504	6,207	1,911	7,1	2,129	10,333

Tableau No 1: Vérification de la précision des différentes méthodes d'analyses.

On peut remarquer (tableau No 1) que la variabilité des méthodes employées dans les différentes analyses est en général assez basse. En exprimant la déviation standard sous forme de pourcentage de la moyenne (Coefficient de variabilité), nous pouvons observer que ce coefficient présente la valeur minimale de 1,911 % pour les analyses de la béta-glucuronidase et une valeur maximale de 7,1 % pour celles de la cathepsine D.

3.2. Résultats des analyses de trois lavages successifs chez le même patient.

Lors de trois lavages successifs chez le même patient, on a pu remarquer que la concentration de toutes les substances analysées présentait une diminution progressive du premier au troisième rinçage. Cette diminution est particulièrement bien illustrée par le comportement des deux enzymes phosphatase acide et alcaline, ainsi que pour les protéines totales. Le graphique No 1 montre la diminution de ces trois composants dans trois lavages successifs. L'axe des ordonnées indique le pourcentage et l'axe des abscisses le nombre de lavages.



Graphique No 1: Diminution du taux de protéines ainsi que des phosphatases dans trois lavages successifs.

En ordonnée: Les pourcentages.

En abscisse: Les lavages.

Le graphique révèle que le taux de décroissance n'est pas le même pour les trois composants. La décroissance la moins rapide a été observée par les protéines. Les deux enzymes présentent pratiquement le même comportement.

3.3. Variabilité pendant la journée.

Comme il a été expliqué sous " Matériel et Méthodes ", la variabilité du contenu du produit de rinçage pendant la journée a été étudiée en procédant, chez deux sujets, à trois lavages par jour à des moments précis. En général, soit pour les enzymes soit pour les protéines totales, une grande variabilité a été remarquée d'un moment à l'autre de la journée. A titre d'exemple, les moyennes des résultats obtenus chez l'un des deux sujets le matin, à midi et le soir sont présentés avec leurs déviations standard, dans le tableau No 11.

	9 h		12 h		16 h	
	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
Phosphatase acide	2,422	1,098	3,600	0,985	3,020	0,758
Phosphatase alcaline	0,396	0,202	0,0479	0,0295	0,267	0,141
Béta-glucuronidase	0,072	0,063	0,064	0,02	0,059	0,014
Protéines	57,22	20,02	76,67	30,10	70,00	11,18

Tableau No 11: Variabilité des quatre enzymes étudiés à différents moments de la journée.

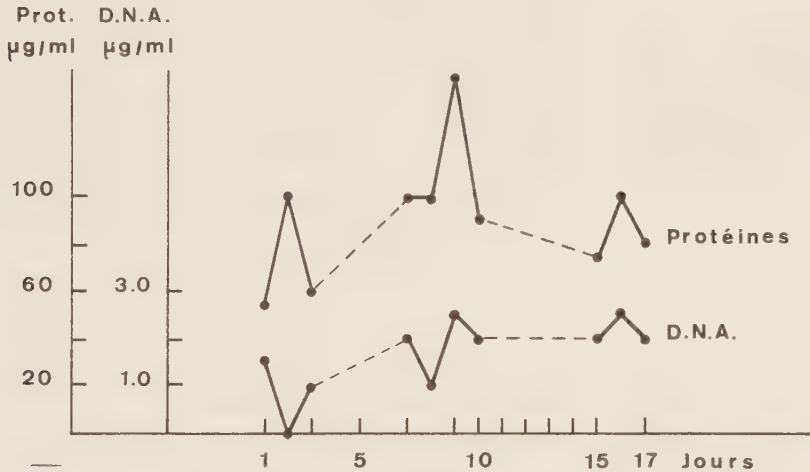
En considérant l'importance relative des déviations standards par rapport aux moyennes, il est évident qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs des différents paramètres aux trois moments de la journée.

3.4. Etude longitudinale.

Dans la dernière étape de notre étude dix lavages échelonnés sur dix-sept jours ont été effectués chez nos deux sujets comme cela a été expliqué dans le chapitre précédent. Nous présenterons d'abord les résultats des analyses des protéines et DNA et ensuite ceux concernant les enzymes.

3.4.1. Concentration des protéines totales et de DNA par ml de produit de rinçage.

Le graphique No 11 montre la concentration des protéines et de DNA dans dix lavages échelonnés sur dix-sept jours. L'axe des ordonnées indique le taux exprimé en μg / ml; celui des abscisses les jours.



Graphique No 11: Variation des taux des protéines et du DNA dans dix lavages échelonnés sur dix-sept jours.

En ordonnée: Le taux exprimé en microgramme par millilitre.
En abscisse: En trait plein: Les jours de lavages.
En trait tiré: Les jours de repos.

Comme on peut le remarquer la concentration des deux substances est assez variable d'une journée à l'autre. La moyenne pour le taux de protéines était en effet $1,05 \mu\text{g/ml}$ avec une déviation standard de $0,78$. Quant au DNA, sa moyenne se situe à une valeur de $0,131 \mu\text{g/ml}$ avec une déviation standard de $0,045$.

Le comportement de la concentration des enzymes phosphatase acide et alcaline ainsi que de la b β -glucuronidase et de la cathepsine D est présenté dans les tableaux 3,4 et 5.

3.4.2. Activité enzymatique exprimée par ml de produit de rinçage.

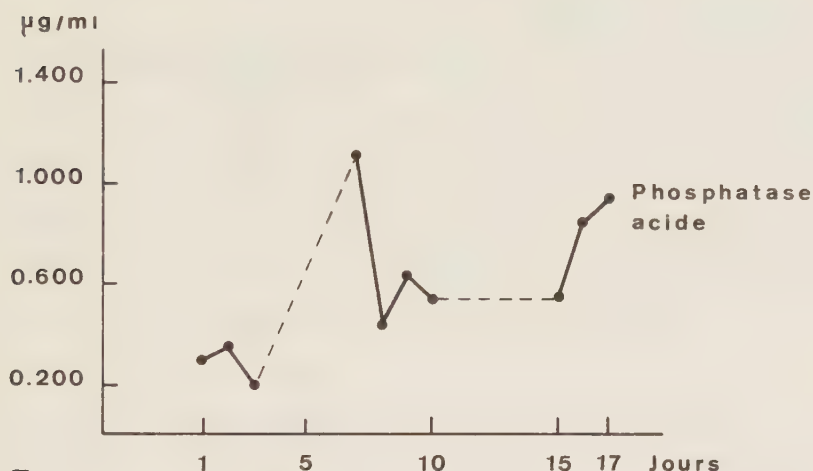
Le tableau No 111 indique l'activité enzymatique par ml de produit de rinçage. Pour chaque enzyme étudié nous avons calculé la moyenne de dix lavages ainsi que leur déviation standard et le coefficient de variabilité.

	Moyenne	Déviati on standard	CV
Phosphatase acide	0,588	0,292	49,6
Phosphatase alcaline	0,405	0,239	59
Bé ta-glucuronidase	0,028	0,007	25
Cathepsine D	0,075	0,015	20

Tableau No 111: Activité enzymatique par ml de produit de rinçage.

En considérant les valeurs des coefficients de variabilité nous pouvons constater que la concentration des différents enzymes varie grandement d'une personne à l'autre. Ceci est particulièrement vrai pour les phosphatases. Quant à la bé ta-glucuronidase, nous avons enregistré un coefficient de variabilité de 25 %. Le coefficient mesurant la variabilité de la concentration de cathepsine était de 20 %.

Pour enregistrer la variabilité de la concentration enzymatique pendant cette période de dix-sept jours, nous avons choisi comme exemple le comportement de la phosphatase acide. Le graphique No 111 montre en ordonnée le taux de phosphatase acide par ml de produit de rinçage en en abscisse les jours.



Graphique No 111: Variabilité de la phosphatase acide dans le temps: Comportement de la phosphatase acide pendant dix lavages échelonnés sur dix-sept jours.

En ordonnée: Taux de la phosphatase acide exprimé en microgramme par millilitre.

En abscisse: En trait plein: Les jours de lavages.
En trait tiré: Les jours de repos.

On peut remarquer que la concentration de la phosphatase acide n'est identique qu'au dixième et quinzième jour de notre étude. Les valeurs obtenues pendant les trois premiers jours sont les plus basses de notre période d'investigation. Pendant la deuxième période, allant du septième au dixième jour, la plus grande variabilité de toute la durée de l'étude a été observée (septième au huitième jour). Entre le quinzième et dix-septième jour, une augmentation de la concentration de la phosphatase acide a été notée, elle est plus marquée entre le quinzième et le seizième jour qu'entre le seizième et dix-septième.

3.4.3. Activité enzymatique spécifique exprimée par rapport au DNA et aux protéines.

Le tableau No 4 montre l'activité des quatre enzymes étudiés par μg de DNA. Comme précédemment nous avons déterminé pour chacun des quatre enzymes la moyenne, déviation et le coefficient de variabilité.

	Moyenne	Déviati on standard	CV
Phosphatase acide	0,334	0,125	37,4
Phosphatase alcaline	0,223	0,098	43,9
Bé ta-glucuronidase	0,0169	0,0078	44,8
Cathepsine D	0,0456	0,0228	50

Tableau No 4: Activité enzymatique spécifique exprimée par μg de DNA.

Les chiffres élevés des coefficients de variabilité indiquent également des changements considérables de concentration d'un jour à l'autre. Cependant, lorsqu'on exprime l'activité enzymatique par rapport aux DNA, c'est la cathepsine D qui accuse la plus grande variabilité, avec 50 %, suivie de la bé ta-glucuronidase. Les phosphatases, surtout la phosphatase acide avec 37,4 % sont plus régulières.

Le tableau No 5 représente l'activité spécifique enzymatique en prenant comme référence les protéines. L'activité des phosphatases ainsi que de la bêta-glucuronidase et de la cathepsine D a été exprimée par 100 μ g de protéines. Comme pour les tableaux 3 et 4 les mêmes paramètres ont été retenus.

	Moyenne	Déviati on standard	CV
Phosphatase acide	0,646	0,296	44,8
Phosphatase alcaline	0,466	0,284	60.9
Bêta-glucuronidase	0,0314	0,010	31,8
Cathepsine D	0,0408	0,0173	42,4

Tableau No 5: Activité enzymatique spécifique exprimée par 100 μ g de protéines.

Comme déjà constaté antérieurement les chiffres du coefficient de variabilité traduisent une grande variabilité d'un jour à l'autre. Cette fois-ci, c'est la phosphatase alcaline (avec 60 %) qui présente la variation la plus importante. Elle est suivie par la phosphatase acide.

D'une façon générale, l'observation des tableaux 4 et 5 permet de constater une variabilité très élevée des activités spécifiques, soit quand celle-ci est exprimée en fonction du DNA (Tableau No 4) soit en fonction des protéines (Tableau No 5).

4. DISCUSSION

Après la mise au point d'un appareillage permettant de réaliser un rinçage de la région parodontale marginale, le but du présent travail a été de suivre dans le temps la concentration de certains paramètres contenus dans le produit de rinçage.

Nous avons ainsi étudié, par des techniques standardisées et contrôlées, les paramètres suivants: protéines totales, DNA, phosphatase acide, phosphatase alcaline, bêta-glucuronidase, Cathepsine D (27,24,33,19,28,1,38).

Une constatation générale résultant de l'observation de l'ensemble des résultats, est que tous les paramètres étudiés présentaient une assez grande variabilité pendant la journée et d'un jour à l'autre chez le même individu. A ce sujet il convient de rappeler que les variations remarquées ne peuvent pas être en rapport avec des erreurs de techniques d'analyses. Il faut en effet observer que lors de séries d'analyses-contrôles effectuées sur le même échantillon de produit de rinçage, les résultats ont montré un coefficient de variabilité très bas. D'un autre côté, lorsque certains paramètres ont été analysés dans trois lavages successifs obtenus chez le même patient en laissant l'appareillage en place (cf. graphique No 1), on a régulièrement remarqué une diminution de la concentration du 1^{er} au 3^{ème} lavage.

Concernant les protéines, nous avons confirmé que le produit de rinçage de la région marginale contient une concentration moyenne de protéines totales de 165 mg / ml. Lors de rinçages à différents moments de la journée et dans des séries de rinçages réparties sur une période de 17 jours, des variations élevées ont été remarquées.

Les sources de protéines au niveau de la région marginale sont disparates. Parmi celles-ci, il faut mentionner les différents types de cellules apparaissant au niveau de la région

marginale, en particulier les cellules épithéliales desquamées et les leucocytes ayant migré du tissu conjonctif vers la cavité buccale (26).

Les variations de la vitesse de renouvellement des cellules épithéliales ont été étudiées par plusieurs auteurs. MUEHLEMANN et HARTL (30) ont préparé des coupes histologiques des quadrants molaires inférieurs et ils ont dénombré le nombre de mitoses au niveau de la basale de l'épithélium des papilles interdentaires.

Ces auteurs ont ainsi pu démontrer que le nombre de mitoses était supérieur chez les rats sacrifiés le matin (day-rats) que chez ceux sacrifiés le soir (night-rats). Une périodicité jour-nuit semble donc exister chez ce rongeur. BEAGRIE et SKOUGAARD (5) ont constaté que chez la souris le temps de migration d'une cellule épithéliale depuis la couche basale en direction de la surface pour y être desquamée varie suivant la zone de gencive considérée. En adoptant la nomenclature et la même classification de l'épithélium qu'ont proposée HIRT, HARTL et MUEHLEMANN (22) BEAGRIE et SKOUGAARD (5) ont trouvé que cette migration au niveau de l'épithélium buccal dure 10 à 12 jours, alors qu'elle est de 24 heures à 5 jours au niveau de l'attache épithéliale. SKOUGAARD (37), a publié une liste d'auteurs ayant fait des études sur le renouvellement épithélial des gencives chez différents animaux et chez l'homme. En ce qui concerne les chiffres de durée de renouvellement chez l'homme, elles montrent une grande variabilité et se situent, pour l'épithélium gingival attaché, entre 28,6 et 112 jours.

Quant aux leucocytes, on sait que la principale "porte d'entrée" dans la cavité buccale est précisément constituée par la zone du sillon gingivo-dentaire (26,43,35,20,25). CALONIUS et BERG (11) ont comparé le taux de leucocytes salivaire chez des édentés et des personnes ayant des dents. Les deux chercheurs ont constaté que la concentration des leucocytes était très inférieure dans la salive des édentés. La présence des dents et des régions marginales associées

semble donc être primordiale pour la présence de leucocytes dans la cavité buccale. Ces trouvailles ont été étayées par les travaux de SCHIOTT et LOE (34). Ces deux chercheurs ont d'abord prouvé que dans une série de six rinçages de bouche successifs, le nombre des leucocytes que l'on récupère atteint un niveau minimal et ne subit par la suite, plus de variations. Pour prouver l'origine de ces cellules, les auteurs ont d'abord déterminé la quantité de leucocytes dans ces dix rinçages de bouche consécutifs. Ensuite, deux gouttières recouvrant les dents et la région marginale des deux arcades ont été insérées et laissées en bouche pendant cinq minutes. Après ce temps, dix autres rinçages ont été effectués sur une série de cinq minutes et les leucocytes énumérés à nouveau. Lors des dix premiers rinçages, le nombre de leucocytes diminuait fortement du premier au cinquième pour atteindre un plateau dans les cinq derniers. Cette même allure exponentielle caractérisait le nombre de leucocytes dans la deuxième série, après que les volontaires avaient porté les gouttières. En se basant sur le nombre de leucocytes retrouvés dans les rinçages Nos 6 à 10 de la première série (plateau), les auteurs ont pu estimer le nombre de leucocytes qui devaient s'accumuler sous les gouttières. Or, le nombre de leucocytes retrouvés dans la deuxième série de rinçage aurait dû grossièrement correspondre au double de cette valeur (leucocytes accumulés sous la gouttière plus leucocytes des cinq minutes de la deuxième série de rinçages après le port de l'appareil). Les chiffres donnés par SCHIOTT et LOE pour une série d'expériences de plusieurs volontaires indiquent que cela était bien le cas, ce qui signifie donc que pratiquement la totalité des leucocytes présents au niveau de la cavité buccale provient de la région parodontale marginale.

Dans ce même travail les auteurs ont constaté que chez le même individu, il existe une variabilité journalière considérable du nombre de leucocytes avec, par exemple, une forte augmentation entre 8h et 12h (rapport de 1 à 5).

Il est donc possible que la grande variabilité de nos différents paramètres soit, en partie, le reflet de variations

dans le rythme de renouvellement des cellules épithéliales et dans l'intensité de migration des leucocytes.

Une autre source de protéines pourrait être représentée par le fluide gingival: BANG et CIMASONI (4) ont démontré que cet exsudat inflammatoire contient une concentration de protéines totales semblable à celle du sérum. Or, au sujet du problème de la variabilité il faut également rappeler que la quantité de fluide subit une considérable variation journalière chez le même sujet (6). A part les deux sources de protéines dont nous venons de parler, il faut également rappeler que le produit de lavage entraîne une certaine quantité de plaque, qui, on le sait, contient aussi du matériel protéinique.

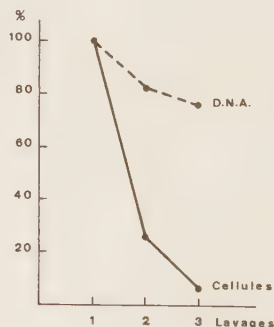
L'acide désoxyriboncléique (DNA) a été déterminé dans notre travail en tant que marqueur de la quantité des cellules se trouvant dans le produit de rinçage. Sa concentration était également très variable chez le même individu à différents moments de la journée et pendant la période d'observation de 17 jours. Ce fait pourrait trouver son explication entre autres, dans la variabilité du nombre de cellules épithéliales et sanguines apparaissant au niveau marginal. De plus il faut rappeler qu'une variation dans la synthèse du DNA au niveau du tissu gingival, a été observée par certains auteurs, chez le rat et le hamster (16, 17,18). On sait également que cette synthèse de DNA varie considérablement d'une région gingivale à une autre (16,17,18).

Pour tester l'hypothèse que la concentration du DNA est bien un reflet de la quantité de cellules contenues dans le liquide de rinçage, nous avons procédé à quelques observations complémentaires. Il fallait en particulier pouvoir exclure la possibilité d'une libération de DNA à partir de bactéries. Nous avons donc procédé à plusieurs reprises à 3 lavages successifs chez le même patient sans ôter la gouttière de la bouche. Dans quelques lavages, nous avons d'un côté déterminé la teneur en DNA et d'un autre côté, nous avons procédé au comptage du nombre des cellules. Pour ce comptage la méthode de ADDIS a été utilisée: elle consiste à évaluer

le nombre de cellules, sans coloration préalable, contenues dans 1 ml de produit de rinçage. Pour ce faire, 1 ml de produit de rinçage a été centrifugé. Dans le but d'obtenir une concentration de cellules 10 fois supérieure, 0,9 ml de surnageant ont été éliminés après cette centrifugation. Une fois cette concentration atteinte, le comptage a été effectué sur une plaque quadrillée de NEUBERGER à l'aide d'un microscope. Le procédé permet l'évaluation des cellules épithéliales et des leucocytes.

Les résultats du comptage des cellules ainsi que le taux de DNA ont été exprimés dans le graphique No 4. L'axe des abscisses indique le nombre de lavages, celui des ordonnées la concentration de DNA et le nombre de cellules, les deux paramètres étant exprimés sous forme de pourcent, la valeur initiale étant considérée comme le 100 %.

Comportement du taux de DNA et du nombre de cellules dans trois lavages successifs.



En ordonnée: Les pourcentages

En abscisse: Le nombre des lavages

Comme l'indique le graphique No 4, la concentration du DNA et celle des cellules ont diminué du 1er au 3ème lavage. Cependant, le taux de décroissance n'était pas superposable: en ce qui concerne le DNA, nous pouvons remarquer que sa concentration, représentée en pourcentage de sa valeur initiale (1er rinçage), tombe à une valeur d'à peu près 82 % lors du 2ème rinçage et de 76 % pour le troisième rinçage. Ceci ne semble pas être le cas pour la concentration cellulaire: la diminution de cette concentration est surtout marqué entre le 1er et le deuxième lavage où le taux passe de 100 à 26 %, alors que la concentration

du 3ème rinçage ne représente que le 17 % du premier.

Etant donné ces différences importantes dans l'allure des deux courbes, il faut admettre qu'une source autre que les cellules, en toute probabilité les micro-organismes, est à l'origine du DNA mesuré dans le produit de rinçage gingival.

Comme SUDAN l'avait déjà démontré (38), le produit de rinçage de la région marginale contient d'assez importantes concentrations d'enzymes d'origine soit lysosomale, soit bactérienne. La phosphatase acide, tout comme la bêta-glucuronidase, ont souvent été employées comme " marqueurs " lysosomaux. Leur présence au niveau de ces organelles cellulaires a été démontrée par plusieurs auteurs (13,21). En ce qui concerne le parodonte, il a été prouvé que le fluide gingival contient des concentrations très élevées de phosphatase acide et de bêta-glucuronidase (3,39). Quant à la cathepsine D, cette protéase acide est typique des lysosomes et semble être totalement absente des bactéries habitant le sillon gingivo-dentaire (23).

Le rôle possible des enzymes lysosomaux dans la parodontite a été étudié par plusieurs auteurs. Une corrélation positive et statistiquement significative a en particulier été retrouvée entre les concentrations de cathepsine D et bêta-glucuronidase dans l'exsudat gingival et la profondeur des poches parodontales (3,23).

ATTSTROEM a constaté une récession de la gingivite expérimentale chez le chien au moment où ces animaux sont rendus leucopéniques, ceci était accompagné par une diminution de la concentration de phosphatase acide au niveau du sillon gingivo-dentaire (2).

l'appareillage que nous avons mis au point ainsi que la standardisation des techniques d'analyse de toute une série de paramètres au niveau du produit de rinçage de la région marginale, devrait permettre de tester encore mieux l'hypothèse dont nous venons de parler. Il sera par exemple intéressant de suivre

la concentration d'enzymes lysosomaux et bactériens dans le produit de rinçage pendant l'éclosion d'une gingivite expérimentale chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANSON, M.L.: The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin.
J. gen. Physiol. 22: 79-89, 1938
2. ATTSTROM, R.: Acid phosphatase activity in crevices of healthy and inflamed gingivae in dogs.
European symposium on the prevention of periodontal disease, University of Sussex, Brighton.
H. Kimpton. In press 1970
3. BANG, J., CIMASONI, G. et HELD, A.J.: Beta-glucuronidase correlated with inflammation in the exsudate from human gingiva.
Archs oral Biol. Vol. 15: 445-451, 1970.
4. BANG, J. et CIMASONI, G.: Total protein in human crevicular fluid.
J. dent. Res. 50: 1683, 1971.
5. BEAGRIE, G.S., SKOUGAARD, M.R.: Observation on the life cycle of the gingival epithelial cells of mice as revealed by autoradiography.
Acta odont. Scand. 20: 15-31, 1962.
6. BISSADA, N.F., SCHAFFER, E.M. and HAUS, E.: Circadian periodicity of human crevicular fluid flow.
J. Periodont. 38: 36-40, 1967.
7. BJORN, A.L., KOCH, G. et LINDHE, J.: Evaluation of gingival fluid measurements.
Odont. Revy 16: 381-398, 1964.
8. BRILL, N. et KRASSE, B.: The passage of tissue fluid into the clinically healthy gingival pocket.
Acta odont. Scand. 16: 233-245, 1958.

9. BRILL,N. et BJORN,H.: Passage of tissue fluid into human gingival pockets.
Acta odont. Scand. 17: 11-21, 1959.
10. BRILL,N.: Gingival conditions related to flow of tissue fluid into gingival pockets.
Acta odont. Scand. 18: 421-446, 1961.
11. CALONIUS,P.E.B. and BERG,J.: On the daily variation of the leukocyte count in saliva.
Odont. T. 66: 551-561, 1958.
12. CIMASONI,G.: The crevicular fluid.
Monographs in oral science. Ed. by. H. Myers
Karger, Basel, 1974.
13. DE DUVE,C.: The lysosomes.
Scient. Am. 208: 64-72, 1963.
14. EGELBERG,J.: Gingival exsudate measurements for evaluation of inflammatory changes in the gingivae.
15. EGELBERG,J.: Permeability of the dento-gingival blood vessels.
I.-Application of the vascular labelling method and gingival fluid measurements.
J. period. Res. 1: 180-191, 1966.
16. ENGLAND,M.C. and BURKE,G.W.: Diurnal variation in deoxyribonucleic acid synthesis in selected epithelial tissues of male rats.
J. Dent. Res. Vol. 47: 478-481, 1968.
17. ENGLAND,M.C. and BURKE,G.W.: Autoradiographic demonstration of DNA synthesis in selected epithelial tissues in male rats.
J. Dent. Res. Vol. 48: 1219-1223, 1968.

18. ENGLAND, M.C. and BURKE, G.W.: Diurnal variation in DNA synthesis in hamster oral epithelium.
J. Dent. Res. Vol. 50: 976, 1971.
19. FERNLEY, H.U. and WALKER, P.G.: Kinetic behaviour of calf-intestinal alkaline phosphatase with 4-Methylumbellideryl-Phosphate.
Biochem. J. 97: 95-103, 1965.
20. FRANK, R. et CIMASONI, G.: Ultrastructure de l'épithélium cliniquement normal du sillon et de la jonction gingivo-dentaire.
Z. Zellforsch. 109: 356-379, 1970.
21. HEPPEL, L.A.: Selective release of enzymes from bacteria.
Science 156: 1451-1455, 1967.
22. HIRT, C.M., HARTL, S. et MUEHLEMAN, H.E.: The distribution of mitoses in the interdental papillae of the rat molar.
J. Periodont. 26: 229, 1955.
23. ISHIKAWA, I., CIMASONI, G. et AHMAD-ZADEH, C.: Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of periodontitis: a study on cathepsin D in human gingival fluid.
Arch. oral biol. 17: 111-117, 1972.
24. KISSANE, J.M. and ROBINS, E.: The Fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system.
J. Biol. Chem. 233: 184-188, 1958.
25. LANGE, D. and SCHROEDER, H.: Cytochemistry and ultrastructure of gingival sulcus cells.
Hch. odont. Acta 15 Vi suppl. 65-86, 1971.

26. LOE, H.: Physiological aspect of the gingival pocket. An experimental study.
Acta Odont. Scand. 19: 387-395, 1961.
27. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. chem. Vol. 193: 266-275, 1951.
28. MAED, A. R., SMITH, J. U. and WILLIAMS, R. T.: The Biosynthesis of the glucuronides of Umbeliferone and 4-Methylumbelliferone and their use in fluorimetric determination of beta-glucuronidase.
Biochem. J. 61: 569-574, 1955.
29. MESSIER, B. and LEBLOND, C. P.: Celle proliferation and migration as revealed by autoradiography after injection of thymidine -H³ into male rats and mice.
J. Anat. 106: 247, 1960.
30. MUEHLEMAN, H. R. and HARTL, S. T.: Daily variations of mitotic rate and inflammatory cell migration in the epithelium of the intermolar rat papilla.
Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. 11: 379-385, 1955.
31. OPPENHEIM, F. G.: Preliminary observations on the presence and origine of serum albumin in human saliva.
Helv. Odont. Acta. Volume 14: 10-17, 1970.
32. REBSTEIN, F.: La jonction entre l'épithélium et l'émail chez l'homme.
Etude histologique et histochimique.
J. Parodontologie 22: 207-266, 1968.
33. ROBINSON, D. et WILLCOX, P.: 4-Methylumbelliferyl-phosphate on a substrate for lysosomal acid phosphatase.
34. SCHIOTT, C. R. and LOE, H.: The origine and variation in number of leucocytes in the human saliva.
J. Periodont. Res. 5: 36-41, 1970.

35. SCHROEDER, H.E.: Quantitative parameters of early human gingival inflammation.
Arch. oral Biol. 15: 383-400, 1970.
36. SCHROEDER, H.E. and LISTGARDEN, M.: Fine structure of the developing epithelial attachment of human teeth.
Karger, Basel, 1971.
37. SKOUGAARD, U.: Turnover of gingival epithelium in marmosets
Acta odont. Scand. 23: 623-43, 1965.
38. SUDAN, J.M.: Produit de rinçage de la région parodontale: Etude biochimique.
Thèse Université de Genève. Sous presse.
39. SUEDA, T., CIMASONI, G. et HELD, A.J.: High levels of acid phosphatase in human gingival fluid.
Arch. oral Biol. 12: 1205-1207, 1967.
40. TAICHMAN, N.S., FREEDMAN, H.L. et URIUHARA, T.: Inflammation and tissue injury. 1.-The response to intersermal injections of human dentò-gingival plaque in normal and leukopenic rabbits.
Arch. oral Biol. 11: 1385-1392, 1966.
41. VALAZZA, A.: Phosphatase acide, bêta-glucuronidase et cathepsine D dans des microquantités de fluide gingival.
Acta Parodontologica, dans Rev. mens. suisse. Odonto-stomatol 83, 1973.
42. WAERHAUG, J.: The gingival pocket. Anatomy, pathology, deepening and elimination.
Odont. Tidsk. 60: suppl. 1, 1952.
43. WRIGHT, D.E.: The source and rate of entry of leukocytes in the human mouth.
Arch. oral Biol. 9: 321-324, 1964.

